富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊羔羊小肠黏膜形态和直肠菌群的影响

程连平　舒迎霜　贺濛初　夏晓冬　李　玉　冯士彬　王希春　吴金节*

（安徽农业大学动物科技学院，安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室，合肥 230036）

摘　要：本试验旨在研究富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊断奶羔羊小肠黏膜形态和直肠菌群的影响。选取体况良好、体重为（9.65±0.38） kg 的湖羊断奶羔羊 21 只，随机分为 3 组，即对照组、富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组，每组 7 只羊。对照组饲喂基础饲粮，试验组富硒酵母和枯草芽孢杆菌制剂按照 100 g/t 的比例在精料中添加。试验期为 28 d。结果表明：1）与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组的十二指肠、空肠、回肠的绒毛高度显著提高（$P<0.05$），十二指肠和回肠的隐窝深度显著降低（$P<0.05$），空肠的隐窝深度极显著降低（$P<0.01$），十二指肠和空肠的绒毛高和隐窝深度比值（V/C）极显著提高（$P<0.01$），回肠 V/C 显著提高（$P<0.05$）。2）富硒酵母和枯草芽孢杆菌的添加影响了湖羊羔羊直肠菌群的α多样性，使得直肠菌群在纲、目、科、属、种水平上呈现不同的丰度差异。综上得出，在饲粮中添加富硒酵母和枯草芽孢杆菌能够促进湖羊羔羊小肠各段的发育，增加直肠有益菌群的丰度，降低有害菌群的增殖。

关键词：富硒酵母；枯草芽孢杆菌；湖羊羔羊；小肠黏膜形态；直肠菌群

中图分类号：S826　　　　文献标识码：　　　　文章编号：

收稿日期：2018-04-16

基金项目：2018 年安徽省重点研究与开发计划（1804g07020187）；地方畜禽遗传资源保护与生物育种安徽省重点实验室开放课题（AKLGRCB2017009）；安徽省现代农业牛羊产业技术体系（AHCYJSTX-07）

作者简介：程连平（1994-），男，山东济南人，硕士研究生，研究方向为动物临床诊疗技术。E-mail: chenglianping8@163.com

* **通信作者：**吴金节，教授，硕士生导师，E-mail: wjj@ahau.edu.cn

近年来，我国养殖场抗生素的滥用导致细菌耐药性不断增加，造成养殖动物的抗病性降低、畜产品药物残留等问题，严重制约了养殖业的发展[1]。因此，在畜禽生产中开发绿色安全、高效、无残留的抗生素替代品已成为研究热点和必然趋势。微生态制剂具有生物拮抗作用，能抑制致病菌的侵入和定植，促进营养物质的消化、吸收及免疫力的提高[2]，目前广泛应用于畜牧生产。

湖羊羔羊在断奶后，由于应激反应明显，导致食欲下降、免疫力低下、腹泻等，影响湖羊的生长发育。研究表明，饲粮中添加富硒酵母和枯草芽孢杆菌可以促进畜禽肠道的发育，并改善肠道菌群[3-4]，但有关富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊羔羊的促生长作用及其机理未见报道。因此，本试验以 45 日龄的湖羊断奶羔羊为试验动物，通过在饲粮中添加富硒酵母和枯草芽孢杆菌，探讨其对小肠黏膜形态和肠道菌群的影响，为微生态制剂在反刍动物的进一步开发应用提供试验依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料与动物

试验所用枯草芽孢杆菌制剂购自株洲智荟生物科技有限公司，有效活菌数为 1×10^{10} CFU/g；富硒酵母购自安琪酵母有限公司，硒含量为 2 000 mg/kg。试验动物为 45 日龄湖羊断奶羔羊，由安徽省马鞍山市金农牧业有限公司提供。

1.2　试验设计

选取 21 只 45 日龄体况良好、平均体重为（9.65±0.38） kg 的湖羊断奶羔羊，随机分为 3 组，即对照组、富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组，每组 7 只羊。试验期 28 d。参照《肉羊饲养标准》[5]配制基础饲粮（由安徽省马鞍山市金农牧业有限公司提供），对照组饲喂基础饲粮，富硒酵母和枯草芽孢杆菌制剂按照 100 g/t 的比例在精料中添加。基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels[2)]	含量 Content
麸皮 Wheat bran	5.00	代谢能 ME/(MJ/kg)	1.80
花生秧 Peanut vine	20.00	钙 Ca	1.54
玉米 Corn	44.50	磷 P	0.34
豆粕 Soybean meal	25.00	干物质 DM	87.60
预混料 Premix[1)]	5.00	粗蛋白质 CP	18.80
食盐 NaCl	20.00	粗脂肪 EE	2.20
合计 Total	100.00	中性洗涤纤维 NDF	16.20
		酸性洗涤纤维 ADF	25.40

[1)]每千克预混料含有 One kg of premix contained the following：VA 120 000 IU，VD_3 60 000 IU，VE 1 900 mg，烟酸 niacin 360 mg，Zn 1.8 g，Cu 0.22 g，Mn 2.0 g，Ca 150 g，P 15 g，NaCl 75 g。

[2)]代谢能、钙、磷为计算值，其他营养水平为实测值。ME, Ca and P were calculated values, while the other nutrient levels were measured values.

1.3　饲养管理

试验在安徽省马鞍山市金农牧业有限公司羊场进行，在预试时免疫注射三联四防疫苗，并注射伊维菌素溶液（0.2 mg/kg）进行驱虫处理。每天根据前 1 天料盆内剩余料重调整饲喂量，自由饮水。

1.4　样品采集

在试验的第 28 天，每组随机解剖 3 只羔羊。将小肠各段结合处用细线扎紧，以防污染

样品，依次剪取十二指肠、空肠和回肠，并将小肠各段放入4%多聚甲醛固定液，用于苏木素-伊红（HE）染色检测肠道黏膜形态。

在无菌的条件下，将直肠内容物放于10 mL灭菌离心管中，冻存于-80 ℃冰箱保存。

1.5　小肠组织形态学测定

从十二指肠、空肠、回肠中间截取2 cm肠断，常规酒精脱水，石蜡切片后包埋，切片厚度5 μm，经HE染色后，树胶封片。在光学显微镜下观察，比较小肠绒毛的形态结构。每段小肠各取5张HE染色切片，每张切片选5个视野，数码拍照，应用Image pro-Plus 6.0图像处理软件在每张照片中测量5根最长的肠绒毛高度（以肠腺绒毛连接处到绒毛顶端为准）、最深的隐窝深度（以肠腺绒毛连接处到肠腺基部为准），并且计算绒毛高度与隐窝深度比值（V/C）。

1.6　肠道菌群的高通量测序

每组分别选取3份直肠内容物样品,称取0.2 g，采用DNA提取试剂盒提取DNA，样品浓度通过Qubit分光光度计检测。根据16S rDNA基因的V4区保守序列设计通用引物：上游引物是5′-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3′，下游引物是5′-GGACTACHVGGGTWTCTATT-3′。PCR体系(50 μL)为：5 μL 10×Buffer A，1 μL 10 mmol/L dNTP，4 μL PCR Primer Cocktail，2 μL Primer F，0.2 μL KAPA Taq，25 μL PCR Master Mix，30 ng DNA和12.8 μL ddH_2O。PCR程序为：98 ℃预变性3 min，98 ℃变性45 s，55 ℃退火45 s，72 ℃延伸45 s，30个循环，72 ℃保温7 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。MetaVx™文库构建试剂盒测序文库。高通量测序文库的构建和基于Illumina MiSeq平台的测序由深圳华大基因科技有限公司完成。

16S rDNA测序分析采用QIIME进行质量控制。质控后的序列按照97%的相似性分别聚到1个操作分类单元（OTU）。将具有代表性的序列系统分类到门、纲、目、科、属、种的水平。丰富度和α多样性分析包括Sobs、Chao1、Ace、Shannon和Simpson指数和覆盖率。

1.7 数据统计分析

数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计，多组之间的比较采用单因素方差分析和多重比较法，结果以平均值±标准差表示。P<0.05 为差异显著，P<0.01 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊小肠黏膜形态的影响

由表 2 可知，与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组的十二指肠、空肠、回肠的绒毛高度显著提高（P<0.05），十二指肠和回肠的隐窝深度显著降低（P<0.05），空肠的隐窝深度极显著降低（P<0.01），十二指肠和空肠的 V/C 极显著提高（P<0.01），回肠的 V/C 显著提高（P<0.05）。

表 2 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊小肠黏膜形态的影响

表 2 Effects of selenium-enriched yeast and *Bacillus subtilis* on intestinal mucosal morphology of *Hu* lambs

项目 Items		对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group
绒毛高度 Villus height/μm	十二指肠 Duodenum	351.33±6.57[b]	365.40±5.30[a]	363.86±3.88[a]
	空肠 Jejunum	572.33±6.88[b]	597.46±14.07[a]	599.07±13.41[a]
	回肠 Ileum	769.79±13.73[b]	800.99±797.17[a]	797.17±12.96[a]
	十二指肠	295.04±5.08[a]	279.34.04±6.81[b]	281.39±6.06[b]

	Duodenum			
隐窝深度 Crypt depth/μm	空肠 Jejunum	308.03 ± 8.00^{Aa}	274.81 ± 6.97^{Bb}	278.35 ± 8.91^{Bb}
	回肠 Ileum	398.10 ± 12.27^{a}	366.26 ± 6.18^{b}	359.69 ± 9.76^{b}
	十二指肠 Duodenum	1.19 ± 0.08^{Bb}	1.30 ± 0.06^{Aa}	1.29 ± 0.03^{Aa}
绒毛高度/隐窝深度 V/C	空肠 Jejunum	1.86 ± 0.04^{Bb}	2.17 ± 0.04^{Aa}	2.15 ± 0.04^{Aa}
	回肠 Ileum	1.93 ± 0.04^{b}	2.18 ± 0.04^{a}	2.22 ± 0.02^{a}

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同小写字母表示差异显著(P＜0.05)，不同大写字母表示差异极显著(P＞0.01)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean significant difference (P>0.05), and with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01). The same as below.

2.2 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊羔羊直肠菌群的影响

2.2.1 测序数据质量分析结果

由表 3 可知，分析本试验中所采集的 9 个样品，共得到 483 860 条 Tags，相关 Tags 共计达 482 164 条，所有样品的有效拼接比例均在 99%以上，这说明本试验数据的可靠性较强。

表 3　测序数据统计结果

Table 3　Statistical results of sequencing data

组别 Groups	样品名 Sample name	总成对 read 数量 Total pairs read number/条	拼接的 Tag 数量 Connect Tag number/条	拼接比例 Connect ratio/%	平均长度 Average length/bp	OUT 数量 OUT number/个
对照组 Control group	Con1	53 396	53 167	99.57	253	416
	Con2	53 229	53 051	99.67	252	442
	Con3	53 574	53 382	99.64	253	472
富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	Sel1	53 493	53 334	99.70	252	325
	Sel2	53 999	53 820	99.67	252	335
	Sel3	54 283	54 137	99.73	252	920
枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group	Bac1	53 854	53 663	99.65	253	371
	Bac2	54 075	53 828	99.54	253	429
	Bac3	53 957	53 782	99.68	253	355

2.2.2　样品 OTU 数量及α多样性分析

选取样品中最少的 Tags 条数，在 97%相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU，统计每个样品在每个 OTU 中的丰度信息，OTU 的丰度初步说明了样品的物种丰富程度。通过表 4 得出，9 个样品进行 OTU 聚类分析共产生 4 065 个 OTU。对照组 1 330 个，富硒酵母组 1

580 个，枯草芽孢杆菌组 1 155 个，这说明各组间菌群丰度存在差异，富硒酵母组菌群丰富程度最高。

在 97%的相似度下，得到了每个样品的 OUT 数量，利用 Venn 图可以展示多样品共有和各自特有 OTU 数量，直观展示样品间 OTU 的重叠情况。将样品数据混合后，3 个组在种水平上细菌的群落组成如图 1 所示，3 个样品一共含有不重复的细菌 726 种，其中富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组共同拥有 488 种细菌，富硒酵母组和对照组共同拥有 554 种细菌，枯草芽孢杆菌和对照组共同拥有 482 种细菌。

α多样性是对单个样品中物种多样性的分析，包括 Sobs 指数、Chao1 指数、Ace 指数，Shannon 指数以及 Simpson 指数。前面 4 个指数越大，最后 1 个指数越小，说明样品中的物种越丰富。由表 4 可知，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组 Simpson 指数低于对照组，说明富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组肠道菌群多样性高于对照组。此外，所有样品的覆盖率约等于 1.00%，表明样品中未被检测到的可能性较低。

表 4 样品α多样性分析及样品 OTU 统计

Table 4 Analysis of α diversity and OTU statistics of samples

组别 Groups	样品名称 Sample name	OUT 数量 OTU number	Sobs 指数 Sobs index	Chao1 指数 Chao1 index	Ace 指数 Ace index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Coverage 覆盖率/%
对照组 Control group	Con1	416	416	489.1	486.23	3.57	0.12	1.00
	Con2	442	442	468.37	469.89	4.59	0.13	1.00
	Con3	472	472	546.45	548.24	3.69	0.02	1.00
富硒酵母组 Selenium-enriched yeast	Sel1	325	325	406.14	405.50	2.95	0.07	1.00
	Sel2	335	335	483.53	443.70	2.91	0.07	1.00

group	Sel3	920	920	943. 48	948. 18	5. 08	0. 02	1. 00
枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group	Bac1	371	371	467. 18	449. 48	3. 27	0. 11	1. 00
	Bac 2	429	429	516. 85	515. 05	3. 64	0. 06	1. 00
	Bac 3	355	355	426. 37	427. 77	3. 33	0. 09	1. 00

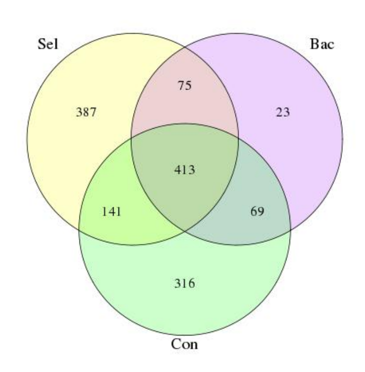


图 1　各组样品种水平 OTU Venn 分析

Fig.1　OTU Venn analysis for each group samples at species level

2.2.3　物种累积曲线及 OTU Rank 曲线分析

物种累积曲线用于描述随着抽样量的加大物种增加的情况，被广泛用于抽样量充分性的判断以及物种丰富度的估计。微生物 OTU Rank 曲线能够展现样品中物种多样性。

由图 2 看出，随机抽到的序列数与观测到的 OTU 数量构建的物种累计曲线分析得出，样品曲线逐渐趋于平缓，说明有效测序数量已经能够较好地覆盖所有试验羔羊肠道菌种的多样性。对各样品的 OTU 丰度大小排序后，由图 3 看出所有样品中物种的 OTU Rank 曲线纵轴的形状逐渐平坦，由此看出，试验中样品的物种分布均匀，可用于多样性分析，可以为后续的样品分析提供基础。

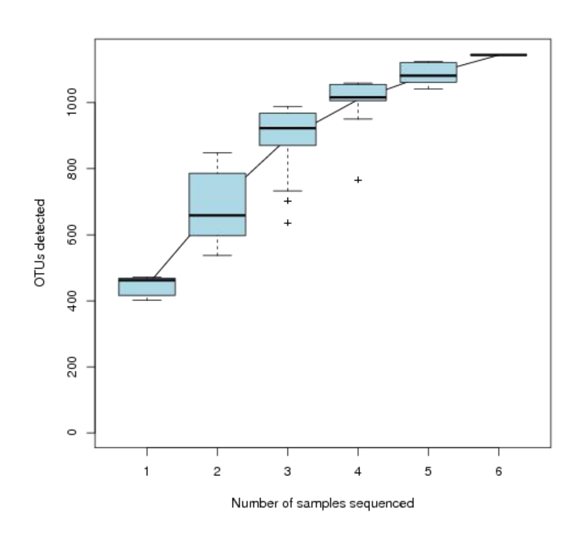


图 2　物种累计曲线图

Fig.2　Species accumulation curve

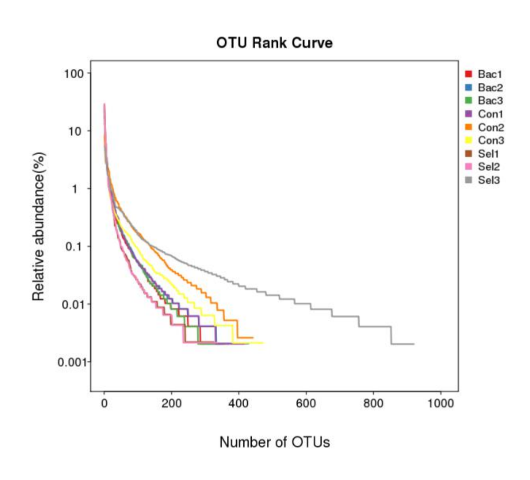


图 3　OTU Rank 曲线图

Fig.3　OTU Rank curve

2.2.4　物种注释分析

通过与数据库进行比对，对 OTU 进行物种分类，并分别在门、纲、目、科、属、种分类水平上对各个样品进行物种分析。

图 4 直观反映了不同门水平物种在每个样品中的相对丰度。由图 4 中得出，9 个

样品中分布最多的是厚壁菌门（Firmicutes），其次是放线菌门（Actinobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、广古菌门（Euryarchaeota），说明这 4 种门水平的细菌是湖羊羔羊直肠的优势菌群。

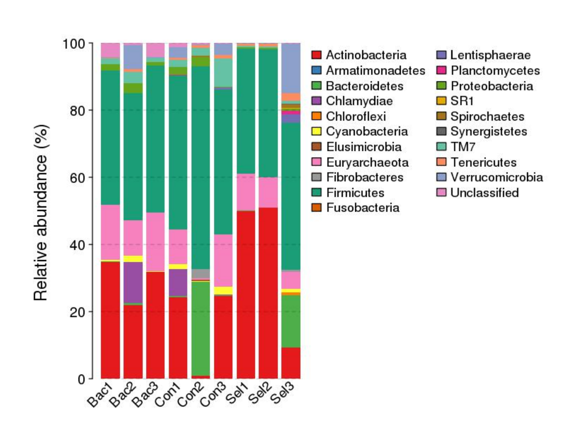


图 4　样品门分类水平中物种分布柱状图

Fig.4　Histogram of species distribution at phylum level

由表 5 可知，与对照组相比发现，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组放线菌纲（Actinobacteria）相对丰度显著增加（P<0.05），梭菌纲（Clostridia）和δ-变形菌纲（Deltaproteobacteria）相对丰度显著降低（P<0.05），产芽胞菌纲（Erysipelotrichi）、甲烷杆菌纲（Methanobacteria）和ε-变形菌纲（Epsilonproteobacteria）相对丰度差异不显著（P>0.05），但有升高的趋势。

表 5　肠道微生物在纲水平的物种相对丰度显著性分析

Table 5　Significance analysis of relative abundance in intestinal microbes at class level　%

纲 Class	对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group

放线菌纲 Actinobacteria	15.47±12.68[b]	30.73±19.22[a]	27.61±6.37[a]
梭菌纲 Clostridia	48.05±10.28[a]	34.18±6.36[b]	35.50±1.76[b]
产芽胞菌纲 Erysipelotrichi	1.61±1.37	5.06±3.44	4.79±1.75
甲烷杆菌纲 Methanobacteria	7.84±7.64	11.29±3.06	14.77±3.76
δ-变形菌纲 Deltaproteobacteria	0.160±0.270[a]	0.006±0.004[b]	0.089±0.150[b]
ε-变形菌 Epsilonproteobacteria	0.660±1.140	0.003±0.006	0.005±0.006

由表 6 可知，在每个样品中双歧杆菌目（Bifidobacteriales）、梭菌目（Clostridiales）、丹毒丝菌目（Erysipelotrichales）、甲烷杆菌目（Methanobacteriales）、拟杆菌目（Bacteroidales）和红椿杆菌目（Coriobacteriales）所占的比例较多。与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组双歧杆菌目、甲烷杆菌目和红椿杆菌目相对丰度显著提高（P<0.05），梭菌目相对丰度显著降低（P<0.05）。

表 6　肠道微生物在目水平的物种相对丰度显著性分析

Table 6　Significance analysis of relative abundance in intestinal microbes at order level　%

目 Order	对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group
梭菌目 Clostridiales	48.05±10.28[a]	34.17±6.35[b]	35.51±1.76[b]
双 歧 杆 菌 目 Bifidobacteriales	14.15±11.51[b]	40.70±10.36[a]	39.59±2.19[a]
丹毒丝菌目 Erysipelotrichales	1.61±1.37	5.06±3.44	4.79±1.75
甲烷杆菌目 Methanobacteriales	7.84±7.64[b]	11.29±3.06[a]	14.77±3.76[a]
拟杆菌目 Bacteroidales	7.57±16.00	5.15±8.87	4.35±0.28
红椿杆菌目 Coriobacteriales	1.13±0.98[b]	6.04±4.49[a]	5.81±0.45[a]

由表 7 可知，在每个样品中双歧杆菌科（Bifidobacteriaceae）、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、甲烷杆菌科（Methanobacteriaceae）、瘤胃球菌科（Ruminococcaceae）和丹毒丝菌科（Erysipelotrichaceae）所占的比例较多。与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组的双歧杆菌科和丹毒丝菌科相对丰度显著提高（$P<0.05$），瘤胃球菌科相对丰度显著降低（$P<0.05$）；富硒酵母组毛螺菌科和甲烷杆菌科相对丰度显著降低（$P<0.05$）。

表 7　肠道微生物在科水平的物种丰度显著性分析

Table 7　Significance analysis of relative abundance in intestinal microbes at family level %

目 Order	对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group
双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae	15.44±12.67[b]	30.70±19.22[a]	27.60±6.38[a]
丹毒丝菌科 Erysipelotrichaceae	1.61±1.37[b]	5.06±3.44[a]	4.79±1.75[a]
毛螺菌科 Lachnospiraceae	26.67±7.66[a]	8.30±3.78[b]	23.96±2.84[a]
甲烷杆菌科 Methanobacteriaceae	8.84±7.64[b]	8.29±3.06[b]	14.77±3.76[a]
瘤胃球菌科 Ruminococcaceae	12.22±15.20[a]	4.34±0.77[b]	3.28±0.84[b]

由表 8 可知，与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、布雷德菌属（*Bulleidia*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）相对丰度显著增加（$P<0.05$），颤螺旋菌属（*Oscillospira*）、梭菌属（*Clostridium*）、粪球菌属（*Coprococcus*）、脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）相对丰度显著降低（$P<0.05$）；富硒酵母组巨型球菌属（*Megasphaera*）相对丰度显著升高（$P<0.05$）；枯草芽孢杆组丁酸弧菌属（*Butyrivibrio*）、

甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacte*）相对丰度显著升高（P<0.05）。

表 8　肠道微生物在属水平的物种丰度显著性分析

Table 8　Significance analysis of relative abundance in intestinal microbes at genus level　%

属 Genus	对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus Subtilis* group
双歧杆菌属 *Bifidobacterium*	5.85±2.72[b]	8.89±5.19[a]	7.87±5.01[a]
丁酸弧菌属 *Butyrivibrio*	9.60±8.47[b]	9.68±3.65[b]	14.01±2.01[a]
布雷德菌属 *Bulleidia*	0.44±0.39[b]	2.66±2.03[a]	1.98±0.65[a]
乳杆菌属 *Lactobacillus*	0.05±0.06[b]	0.12±0.08[a]	0.18±0.08[a]
巨型球菌属 *Megasphaera*	0.04±0.07[b]	7.56±6.61[a]	0.79±0.68[b]
甲烷短杆菌属 *Methanobrevibacter*	7.08±6.58[b]	6.72±1.97[b]	11.01±2.89[a]
颤螺旋菌属 *Oscillospira*	1.98±3.40[a]	0.14±0.12[b]	0.01±0.00[b]

梭菌属 *Clostridium*	1.36±1.02[a]	0.40±0.19[b]	0.27±0.11[b]
粪球菌属 *Coprococcus*	1.62±2.70[a]	0.32±0.53[b]	0.41±0.00[b]
脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*	0.160±0.270[a]	0.029±0.050[b]	0.004±0.004[b]

由表 9 可知，与对照组相比，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组 *Sharpea_azabuensi* 相对丰度显著提高（P<0.05），*Bacteroides_ovatus*、*Bacteroides_uniformis*、*Clostridium_hathewayi*、*Coprococcus_catus* 相对丰度显著降低（P<0.05）；枯草芽孢杆菌组 *Lactobacillus_acidipiscis* 相对丰度显著提高（P<0.05）。

表 9　肠道微生物在种水平的物种丰度显著性分析

Table 9　Significance analysis of relative abundance in intestinal microbes at species level　%

种 Species	对照组 Control group	富硒酵母组 Selenium-enriched yeast group	枯草芽孢杆菌组 *Bacillus subtilis* group
Lactobacillus_ acidipiscis	0.006±0.007[b]	0.018±5.190[b]	0.130±0.110[a]
Sharpea_azabuensis	0.15±0.22[b]	1.48±3.65[a]	1.71±1.48[a]
Bacteroides_ovatus	0.130±0.220[a]	0.004±0.004[b]	0.002±0.002[b]
Bacteroides_uniformis	0.400±0.069[a]	0.002±0.084[b]	0[b]

Clostridium_hathewayi	0.070±0.130[a]	0.010±0.002[b]	0[b]
Coprococcus_catus	0.130±0.020[a]	0.006±0.050[b]	0[b]

3 讨 论

3.1 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对小肠黏膜形态的影响

小肠是动物进行营养物质消化和吸收的重要器官，小肠黏膜的发育程度不仅和动物机体的营养物质摄入息息相关，而且也参与肠道黏膜免疫反应[6]。小肠绒毛高度、隐窝深度及 V/C 是衡量小肠吸收功能的重要指标[7]。有研究证明，在育肥猪饲粮中添加酵母菌能够显著促进十二指肠的发育[8]。Yunusova 等[9]研究表明，在母羊饲粮中添加富硒酵母，发现对分娩后产出羔羊的空肠肠道发育有明显的促进作用。齐博等[10]认为，枯草芽孢杆菌可显著提高肉仔鸡十二指肠绒毛高度和 V/C。Mahmoud 等[11]研究发现，在肉鸡饲粮中添加枯草芽孢杆菌可以显著增加空肠隐窝深度。祁凤华等[12]研究发现，在 1 日龄健康肉鸡饲粮中添加 0.1%枯草芽孢杆菌，能显著提高十二指肠绒毛高度和 V/C。周勃[13]的研究也表明，在肉鸡饲粮中添加枯草芽孢杆菌，能显著提高小肠各段绒毛高度、V/C、黏膜厚度及肌层厚度。从本试验结果看，在湖羊羔羊饲粮中添加富硒酵母和枯草芽孢杆菌显著提高了十二指肠、空肠、回肠的绒毛高显，显著降低了十二指肠和回肠的隐窝深度，极显著提高了十二指肠和空肠的 V/C，说明富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊羔羊的小肠各段的发育有显著的促进作用。

3.2 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对直肠菌群的影响

动物肠道中的菌群可以为宿主消化代谢营养物质，促进肠道的发育，同时抵御病原体，参与机体相关免疫功能的发挥[14]。Lv 等[15]研究在仔猪饲粮中添加富硒酵母对高温环境下肠道微生态的影响，发现乳酸杆菌含量极显著提高。Li 等[16]研究结果表明，酵母菌能增加大鼠肠道微生物数量和多样性，改善肠道免疫功能。刘红露等[17]研究酵母硒对肉鸡肠道菌群

的影响，发现面包酵母硒不但可以增强机体抗氧化能力，而且能改善肠道菌群结构。郑婷婷等[18]研究报道，从土壤中分离的枯草芽孢子杆菌显著提高肉鸡肠道消化球菌、双歧杆菌、乳酸菌以及总厌氧菌群的数量。Wu 等[19]研究证实，在肉鸡饲粮中添加枯草芽孢杆菌后，肠道乳酸杆菌的数量显著提高，大肠杆菌数量显著减少，说明枯草芽孢杆菌可以促进肠道中有益菌群的增殖，降低有害菌群的数量。吴志新等[20]研究指出，枯草芽孢杆菌能够显著增加草鱼肠道中芽孢杆菌的比例和厌氧菌总数、双歧杆菌和乳酸菌的数量。任继平[21]研究指出，不同剂量的芽孢杆菌制剂都能显著提高盲肠或结肠中乳酸杆菌数量。从本试验结果看，富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组中放线菌纲相对丰度显著增加，双歧杆菌目、甲烷杆菌目和红椿杆菌目相对丰度显著提高，双歧杆菌科和丹毒丝菌科相对丰度显著提高。有研究表明，双岐杆菌和乳杆菌能够酵解碳水化合物，促进肠道对营养物质的消化吸收，降低肠道内环境 pH，抑制病原菌的生长入侵，从而保护肠黏膜屏障，提高宿主的免疫机能[22-23]。Kociolek 等[24]研究证实，梭菌可产生外毒素，对人和动物都有较强的毒害作用。本试验中富硒酵母组和枯草芽孢杆菌组直肠中梭菌目相对丰度显著降低。因此，本试验结果说明富硒酵母和枯草芽孢杆菌能增加有益菌群的数量，抑制有害菌群的增殖，从而改善直肠肠道微生态，促进羔羊的消化功能，提高机体免疫力。

4 结 论

在饲粮中添加富硒酵母和枯草芽孢杆菌能够显著提高湖羊羔羊的小肠绒毛高度、V/C，促进小肠各段的发育。富硒酵母和枯草芽孢杆菌能够增加直肠有益菌群的丰度，抑制有害菌群的增殖，提高羔羊机体的免疫力。

参考文献：

[1] 杨晓洪,王娜,叶波平.畜禽养殖中的抗生素残留以及耐药菌和抗性基因研究进展[J].药物生物技术,2014(6):583–588.

[2] SÁNCHEZ B,DELGADO S,BLANCO-MÍGUEZ A,et al.Probiotics,gut microbiota,and their influence on host health and disease[J].Molecular Nutrition & Food Research,2016,61(1),doi:10.1002/mnfr.201600240.

[3] MOHREKESH M,SHAHRAKI A D F,GHALAMKARI G R,et al.Effects of three methods of oral selenium-enriched yeast supplementation on blood components and growth in Holstein dairy calves[J].Animal Production Science,2018,doi:10.1071/AN16417.

[4] GUO P P,LI Y,LIU W,et al.Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* on growth performance,antioxidant capacity,intestinal immunity in *Gushi* female chickens[J].Livestock Science,2017:1,doi:10.1016/j.livsci.2017.09.023.

[5] 张宏福.动物营养参数与饲养标准[M].2 版.北京:中国农业出版社,2010.

[6] CHEN Z,XIE J,WANG B,et al.Effect of γ-aminobutyric acid on digestive enzymes,absorption function,and immune function of intestinal mucosa in heat-stressed chicken[J].Poultry Science, 2014,93(10):2490–2500.

[7] 贺琴,王自蕊,游金明,等.酵母壁多糖对断奶仔猪生长性能和小肠黏膜形态结构的影响[J].动物营养学报,2016,28(11):3536–3541.

[8] 秦红.益生菌对育肥猪肠道屏障功能的影响[D].硕士学位论文.太谷:山西农业大学,2016.

[9] YUNUSOVA R D,NEVILLE T L,VONNAHME K A,et al.Impacts of maternal selenium supply and nutritional plane on visceral tissues and intestinal biology in 180-day-old offspring in sheep[J].Journal of Animal Science,2013,91(5):2229–2242.

[10] 齐博,武书庚,王晶,等.枯草芽孢杆菌对肉仔鸡生长性能、肠道形态和菌群数量的影响[J].动物营养学报,2016,28(6):1748–1756.

[11] MAHMOUD K Z,OBEIDAT B S,AL-SADI M Z,等.枯草芽孢杆菌及饲料粗蛋白质水平对肉鸡生长性能和肉鸡肠道形态的影响[J].饲料博览,2017(1):56.

[12] 祁凤华,杨帆,马红,等.枯草芽孢杆菌与嗜酸乳杆菌对黄羽肉鸡小肠黏膜形态和免疫器官指数的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2015(19):129–131.

[13] 周勃.枯草芽孢杆菌对肉鸡小肠黏膜组织形态结构的影响[J].国外畜牧学(猪与禽),2017,37(8):75–77.

[14] ROUND J L,MAZMANIAN S K.The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J].Nature Reviews Immunology,2009,9(5):313–323.

[15] LV C H,WANG T,REGMI N,et al.Effects of dietary supplementation of selenium-enriched probiotics on production performance and intestinal microbiota of weanling piglets raised under high ambient temperature[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(6):1161–1171.

[16] LI S Y,ZHOU S,WANG X,et al.Yeast surface display of *Escherichia coli* enterotoxin and its effects of intestinal microflora and mucosal immunity[J].Current Microbiology,2017,74(7):854–862.

[17] 刘红露,范磊,戴茜茜,等.面包酵母硒与酪酸梭菌制剂对肉鸡生长、抗氧化和肠道菌群的影响[J].浙江农业学报,2015,27(9):1529–1534.

[18] 郑婷婷,王苇,秦瑶,等.日粮添加耐受性枯草芽孢杆菌 Q04 对肉鸡肠道菌群、生产性能、部分血液生化指标和免疫指标的影响[C]//中国畜牧兽医学会动物微生态学分会第十一次全国学术研讨会暨第五届会员代表大会论文集.重庆.中国畜牧兽医学会动物微生态学分会,2014:147–147.

[19] WU B Q,ZHANG T,GUO L Q,et al.Effects of *Bacillus subtilis* KD1 on broiler intestinal flora[J].Poultry Science,2011,90(11):2493–2499.

[20] 吴志新,冯雪,曲艺,等.枯草芽孢杆菌对草鱼生长、消化和肠道菌群的影响[C]//第九届世界华人鱼虾营养学术研讨会论文集.厦门:中国水产学会,2013:350–350.

[21] 任继平.芽孢杆菌制剂对大肠杆菌感染仔猪免疫应答及肠道菌群影响[D]博士学位论文.北京:中国农业大学,2014.

[22] SANZ Y,NADAL I,SANCHEZ E.Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections[J].Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery,2007,2(2):148–156.

[23] LJUNGH A,WADSTRÖM T.Lactic acid bacteria as probiotics[J].Current Issues in Intestinal Microbiology,2006,7(2):73–89.

[24] KOCIOLEK L K,GERDING D N.Breakthroughs in the treatment and prevention of Clostridium difficile infection[J].Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,2016,13(3):150–160.

Effects of Selenium-Enriched Yeast and *Bacillus subtilis* on Intestinal Mucosal Morphology and Rectum Microflora of *Hu* Lambs

CHENG Lianping SHU Yingshuang HE Mengchu XIA Xiaodong LI Yu FENG Shibin WANG Xichun WU Jinjie*

(*College of Animal Science and Technology*, *The Open Fund of Anhui Province Key Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetical Resource Conservation and Breeding*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230036, *China*)

Abstract: The present experiment was conducted to evaluate the effects of selenium-enriched yeast and *Bacillus subtilis* on intestinal mucosal morphology and rectum microflora of *Hu* lambs. Twenty-one *Hu* Lambs, weighted (9.65±0.38) kg, were divided into 3 groups: control group, selenium-enriched yeast group and *Bacillus subtilis* group, with 7 lambs per group. The lambs in the control group were fed a basal diet, and in experimental groups, 100 g/t selenium-enriched yeast and *Bacillus subtilis* were added into concentrate, respectively. The experiment lasted for 28 days. The results were as follows: 1) compared with the control group, the villus height of duodenum, jejunum and ileum in the selenium enriched yeast group and *Bacillus subtilis* group significantly increased ($P<0.05$). The crypt depth of duodenum and ileum significantly decreased ($P<0.05$), while the crypt depth of jejunum significantly decreased ($P<0.01$). The villus height to crypt depth ratio (V/C) of duodenum and jejunum significantly increased ($P<0.01$), and the V/C of ileum significantly increased ($P<0.05$). 2) The supplement of selenium-enriched yeast and *Bacillus subtilis* affected the α diversity of the rectal flora of *Hu* lambs, resulting in different abundances of the rectal flora at the levels of the class, 0rder, family, genus, species. It is concluded that the supplement of selenium enriched yeast and *Bacillus subtilis* in the diet can significantly enhance the development of the small intestine of lambs, increase the abundance of the beneficial rectum microflora and reduce the proliferation of harmful bacteria.

Key words: selenium-enriched yeast; *Bacillus Subtilis*; *Hu* lambs; intestinal mucosal morphology; rectum microflora

*Corresponding author, professor, E-mail: wjj@ahau.edu.cn （责任编辑 陈 鑫）